



УДК 577.217.335

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТКОВ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ,
УЧАСТВУЮЩИХ В ОБРАЗОВАНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ
СТРУКТУРЫ тРНК^{Leu}_{TAG} МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРОВ

Петрушенко В. М., Тукало М. А., Мацука Г. Х.

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

Участие остатков фосфорной кислоты в образовании третичной структуры тРНК^{Leu}_{TAG} молочной железы коров, принадлежащей к классу тРНК с длинной варируемой петлей, исследовали с помощью алкилирующих реагентов этилнитрозомочевны и метилнитрозомочевны. Показано, что низкий уровень модификации имеют фосфаты следующих нуклеотидов: 7, 8, 9, 10 – на изгибе молекулы между акцепторным и D-стеблем; 18, 19, 20А, 21 D-петли; 47Н, 49 на стыке варируемого и T-стебля; 57, 58, 59 T-петли.

В последнее время для изучения пространственной структуры тРНК в растворе широко применяется метод химической модификации. Используя специфические реагенты, можно определить те основания, которые образуют водородные связи с другими компонентами молекулы или входят в координационные центры металлов, стабилизирующих структуру тРНК.

Более широкую информацию о пространственной структуре молекул тРНК можно получить, используя химические соединения, модифицирующие фосфаты. Ранее было показано, что такими реагентами могут быть этилнитрозомочевина и метилнитрозомочевина [1–5]. Эти соединения могут алкилировать также остатки гуанозина по N7-положению, но степень модификации по гуанину намного ниже, чем по фосфатным группам [4]. Метод модификации тРНК алкилнитрозомочевинами очень прост в исполнении, высокочувствителен благодаря разработке методов быстрого гель-секвенирования и позволяет получать количественные характеристики уровня модификации фосфатов. Реакционная способность фосфатов определяется их доступностью для реагента, которая снижается при образовании ими водородных связей или при взаимодействии их с ионами металлов. Этот метод может применяться для любых видов РНК [5].

Особый интерес представляет использование метода химической модификации для исследования пространственной структуры тех тРНК, рентгеноструктурный анализ которых затруднен или отсутствует. К ним в первую очередь относятся тРНК с длинной варируемой петлей. В настоящей работе модификация алкилнитрозомочевинами использована для изучения пространственной структуры одного из представителей этого класса – тРНК^{Leu}_{TAG} молочной железы коров. Интерес к тРНК^{Leu} вызван их участием в адаптации к направленности белкового синтеза клеток эпителия молочной железы [6]. Первичная структура тРНК^{Leu}_{TAG} была установлена нами ранее [7].

Доступность фосфатов тРНК^{Leu}_{TAG} для алкилирования этилнитрозомочевинной и метилнитрозомочевинной исследовали в условиях, обеспечивающих нативную структуру молекул (0,02 М MgCl₂ и 0,1 М NaCl), и в денатурирующих условиях (80°С в отсутствие ионов Mg²⁺). тРНК предварительно метили ³²P по 3'- или 5'-концу. После алкилирования тРНК^{Leu}_{TAG} была гидролизована по модифицированным фосфатам в слабощелочной среде. Полученные фрагменты анализировали электрофорезом в 12,5%

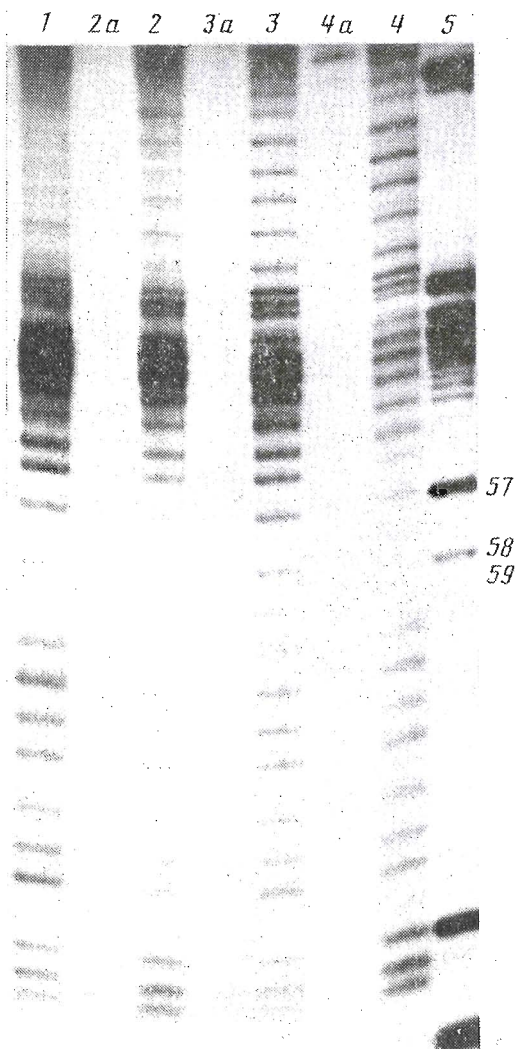


Рис. 1

Рис. 1. Радиоавтограф 12,5% полнакриламидного геля с разделением фрагментов 3'-меченой $\text{tRNA}_{\text{IAG}}^{\text{Leu}}$, полученных в результате гидролиза молекул, алкилированных метилнитрозо- (1, 2) и этилнитрозомочевниной (3, 4) в денатурирующих условиях (1, 3) и в условиях, стабилизирующих пространственную структуру (2, 4); 1a, 2a, 3a, 4a — гидролизаты контрольной инкубации $\text{tRNA}_{\text{IAG}}^{\text{Leu}}$ в отсутствие реагентов; 5 — $\text{tRNA}_{\text{IAG}}^{\text{Leu}}$, частично гидролизованная рибонуклеазой T₁. Указаны номера фосфатов с низким уровнем модификации в условиях, стабилизирующих структуру тРНК

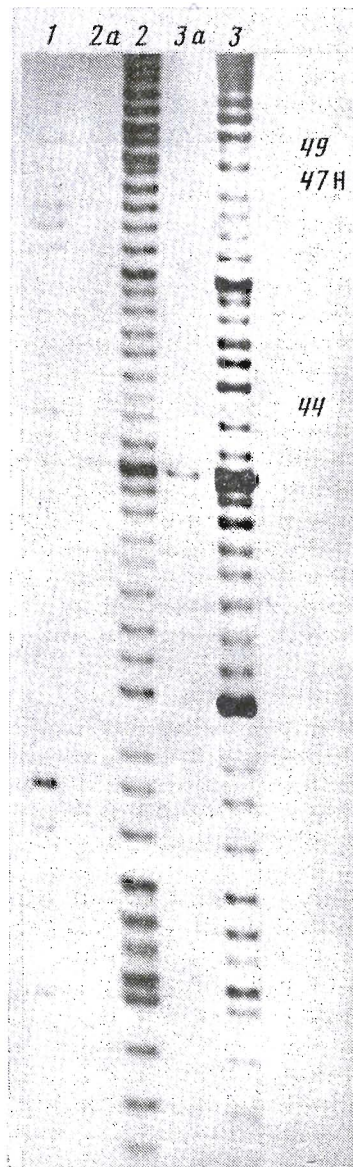


Рис. 2

Рис. 2. Радиоавтограф полиакриламидного геля с разделением фрагментов, полученных в результате гидролиза 5'-меченой $\text{tRNA}_{\text{IAG}}^{\text{Leu}}$, алкилированной этилнитрозомочевниной в денатурирующих условиях (2) и в условиях, стабилизирующих структуру тРНК (3); 2a и 3a — соответствующие контрольные эксперименты; 1 — $\text{tRNA}_{\text{IAG}}^{\text{Leu}}$, частично гидролизованная рибонуклеазой T₁

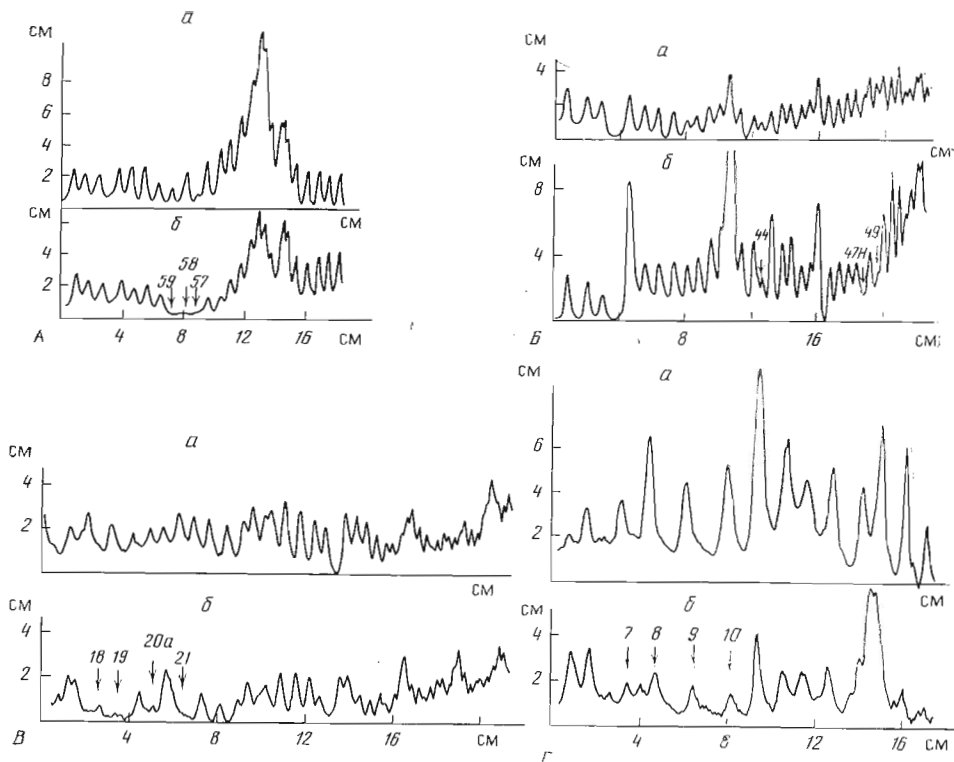


Рис. 3. Денситограммы радиоавтографов полиакриламидных гелей, в которых были разделены фрагменты меченой тРНК^{Leu}_{IAG}, полученные в результате алкилирования этилнитрозомочевниной в денатурирующих условиях (а) и в условиях, сохраняющих нативную структуру молекулы (б). Стрелками указаны фосфаты, имеющие низкий уровень модификации в условиях, стабилизирующих структуру тРНК. А — денситограммы дорожек 3 и 4 радиоавтографа ПААГ, изображенного на рис. 1; В — денситограммы дорожек 2 и 3 радиоавтографа ПААГ, изображенного на рис. 2. Радиоавтографы ПААГ, соответствующие денситограммам В и Г, не приводятся

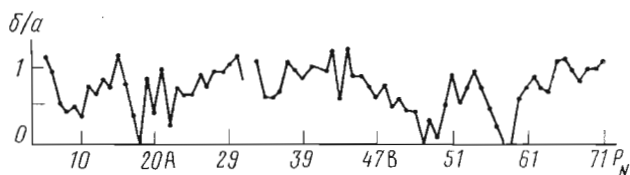


Рис. 4. Относительные реакционные способности фосфатов тРНК^{Leu}_{IAG}, δ/a — отношение интенсивностей соответствующих электрофоретических полос электрофореграмм опытов по алкилированию тРНК в условиях, стабилизирующих структуру молекулы, и в денатурирующих условиях (см. рис. 3). P_N — номера фосфатов

полиакриламидном геле в присутствии 8 М мочевины (рис. 1 и 2). Интенсивности электрофоретических полос, которые отражают степень модификации фосфатов, определяли с помощью сканирующего денситометра (рис. 3).

Из кривой расчета денситограмм видно (рис. 4), что при алкилировании тРНК^{Leu}_{IAG} этилнитрозомочевниной в условиях, когда полимер имеет нативную структуру, низкий уровень модификации имеют фосфаты следующих нуклеотидов: 7, 8, 9, 10, 18, 19, 20А, 21, 44, 47Н, 49, 57, 58, 59. На рис. 5 изображено расположение этих фосфатов в структуре тРНК^{Leu}_{IAG}. Нумерация нуклеотидов дана соответственно нумерации дрожжевой тРНК^{Phe} [8]. Аналогичные результаты были получены при использовании метилнитрозомочевниной, однако уровень модификации был несколько ниже, чем при алкилировании этилнитрозомочевниной.

Большой интерес представляет сравнение данных по модификации этилнитрозомочевниной тРНК I класса (с короткой варибельной петлей)

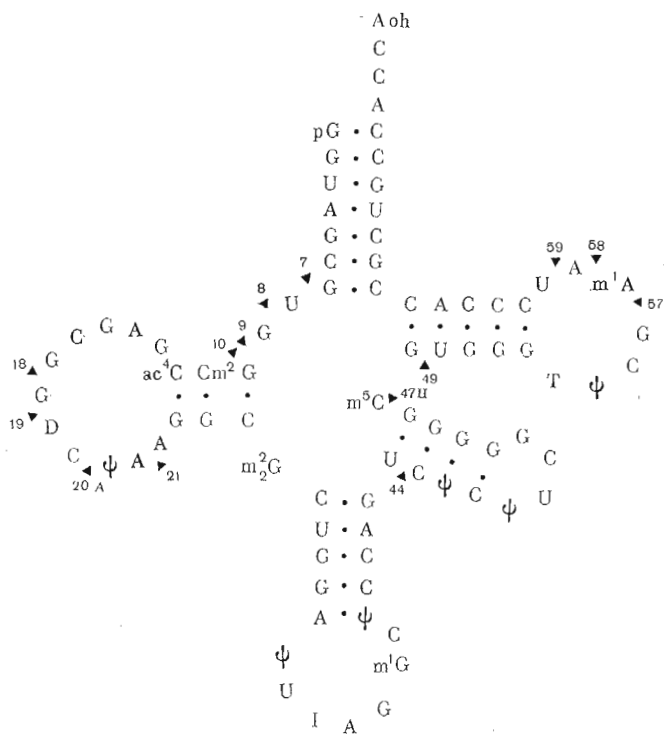


Рис. 5. Структура тРНК^{Leu}_{LAG} в виде клеверного листа. Треугольниками обозначены фосфаты с низким уровнем модификации в условиях, стабилизирующих нативную структуру молекулы

и тРНК II класса (с длиной переменной петли). Проведение такого сравнения облегчается двумя следующими обстоятельствами: а) знанием трехмерной структуры тРНК^{Phe} из дрожжей в кристалле; б) хорошим соответствием данных о пространственной структуре тРНК^{Phe} в кристалле и растворе.

Сравнение данных по химической модификации этилнитрозомочевинной ряда тРНК I класса [4, 5, 9] и данных, полученных нами, показывает, что почти во всех исследованных тРНК низкий уровень модификации имеют фосфаты нуклеотидов 7, 8, 9, 10, 18, 57, 58, 59, что свидетельствует о возможной их общей роли в организации макроструктуры молекулы. Исходя из этого предположения и опираясь на литературные данные об участии фосфатов в формировании пространственной структуры тРНК^{Phe} из дрожжей [10], полученные нами результаты можно интерпретировать следующим образом: фосфаты нуклеотидов 7–10, 18, 19, 20A, 21, 58, 59 взаимодействуют с ионами Mg²⁺, стабилизирующими третичную структуру тРНК; фосфат нуклеотида 57, возможно, образует водородную связь с N3 нуклеотида ψ⁵³, как это происходит в дрожжевой тРНК^{Phe} [11].

Из наших данных видно, что в условиях, обеспечивающих нативную пространственную структуру молекулы, фосфаты длинной переменной петли тРНК^{Leu}_{LAG} высокореакционноспособны по отношению к алкилирующим реагентам. Это свидетельствует об их экспонированности в раствор. Несколько заниженный уровень модификации имеет фосфат нуклеотида 44 в стебле переменной петли. Практически неакционноспособен фосфат нуклеотида 47H на стыке стеблей переменной и T-петли. Фосфаты нуклеотидов 44, 47H и 49 являются, по-видимому, основными структурными элементами молекулы тРНК^{Leu}_{LAG}, поддерживающими определенное положение длинной переменной петли.

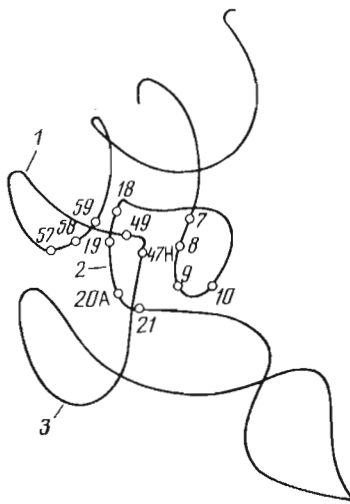


Рис. 6. Расположение фосфатов, участвующих в формировании третичной структуры тРНК^{Leu}_{TAG} из молочной железы коров, на обобщенной модели Сундаралингама [12] для макромолекулярной организации тРНК с длинной вариательной петлей. 1 — Т-петля, 2 — D-петля, 3 — вариательная петля

Таким образом, наши данные по алкилированию остатков фосфорной кислоты тРНК^{Leu}_{TAG} указывают на общность укладки ее рибозофосфатного остова и остова тРНК, имеющих короткую вариательную петлю. Различия, как и следовало ожидать, затрагивают структуру вариательного стебля, экспонированного в раствор и образующего дополнительные третичные взаимодействия. Наши данные по экспонированности фосфатов вариательного стебля тРНК^{Leu}_{TAG} хорошо согласуются с моделью Бренна и Сундаралингама [12], предложенной для макромолекулярной организации тРНК II класса на основании теоретических расчетов. Расположение фосфатов, принимающих участие в образовании пространственной структуры тРНК^{Leu}_{TAG} на обобщенной Сундаралингамом макроструктуре тРНК с длинной вариательной петлей [13], изображено на рис. 6.

В настоящее время нами проводится работа по изучению третичной структуры тРНК^{Leu} с использованием химических реагентов, специфичных к основаниям. Это позволит в комплексе с данными, представленными здесь, получить более полную картину организации пространственной структуры тРНК с длинной вариательной петлей.

Экспериментальная часть

Препарат индивидуальной тРНК^{Leu}_{TAG} выделяли из суммарной тРНК лактирующей молочной железы коров методами, описанными нами ранее [7].

Этилнитрозомочевина и метилнитрозомочевина были синтезированы сотрудником нашего института А. Г. Терентьевым, как описано в работе [14]. В работе использовали $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с уд. акт. 2000–3000 Кп/ммоль (Amersham, Англия); щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1; Worthington, США); Т₁-РНКазу (КФ 3.1.27.3; Sankyo, Япония); полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), выделенную из *E. coli*, инфицированной фагом T4 (Boehringer, ФРГ); тРНК нуклеотидтрансферазу (КФ 2.7.2.1), выделенная, как описано в работе [15], любезно предоставлена А. С. Буториным (Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР).

Мечение тРНК^{Leu}_{TAG} по 3'- и 5'-концу проводили в соответствии с работами [16] и [9].

Частичный гидролиз тРНК Т₁-РНКазой осуществляли как в работе [17].

Алкилирование тРНК^{Leu}_{TAG} этилнитрозомочевинной и метилнитрозомочевинной проводили в двух экспериментальных условиях: стабилизирующих пространственную структуру молекулы (0,3 М каодилат натрия, pH 8,0, содержащий 0,02 М MgCl₂, 0,1 М NaCl, 2·10⁻³ М EDTA, при 23° С в течение 2,5 ч) и в денатурирующих (0,3 М каодилат натрия (pH 8,0), 2·10⁻³ М EDTA, 80° С, 2 мин). В обоих случаях алкилнитрозомочевину добавляли в реакционную смесь в виде насыщенного раствора в этаноле: 5 мкл раствора реагента к 20 мл буферного раствора, содержащего 0,4 мкг тРНК^{Leu}_{TAG}, меченой по одному из концов. В контрольных экспериментах вместо насыщенного раствора реагента был добавлен чистый этанол.

После алкилирования в реакционную смесь добавляли 10 мкг суммарной тРНК, раствор подкисляли 1,5 М ацетатом Na (pH 5,0) и тРНК осаждали спиртом. Расщепление полинуклеотидной цепи по модифицированным остаткам проводили как

описано в работе [4]. Полученные образцы гидролизованной тРНК анализировали гель-электрофорезом в 12.5% полиакриламидном геле в 0,05 М трис-боратном буфере, рН 8,3, содержащем $1 \cdot 10^{-3}$ М EDTA и 8 М мочевины. Отнесение электрофоретических полос проводили сравнением их подвижности с подвижностью фрагментов тРНК^{Leu}_{IAG}, полученных путем частичного гидролиза рибонуклеазой T₁. Радиоавтографы гелей сканировали с помощью микроденситометра фирмы Юйсе, Loebl (Англия). Мы приносим искреннюю благодарность акад. Д. Г. Кюрре и др. хим. наук В. В. Власову (Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР) за поддержку в работе и полезное обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vlassov V. V., Giege R., Ebel J.-P. FEBS Lett., 1980, v. 120, № 1, p. 12-16.
2. Vlassov V. V., Kern D., Romby P., Giege R., Ebel J.-P. Eur. J. Biochem., 1983, v. 132, № 3, p. 537-544.
3. Florentz C., Briand J. P., Romby P., Hirth L., Ebel J.-P., Giege R. EMBO J., 1982, v. 1, № 2, p. 269-276.
4. Barciszewski J., Romby P., Ebel J.-P., Giege R. FEBS Lett., 1982, v. 150, № 2, p. 459-464.
5. Giege R., Romby P., Florentz C., Ebel J.-P., Dumas P., Westhof E., Moras D. In: Nucleic acids: The vectors of life/Eds Pullman B., Jortner J. Tel Aviv: Reidel Publ. Company, 1983, p. 415-426.
6. Мацука Г. Х., Ельская А. В., Коваленко М. И., Корнелиук А. И. Транспортные рибонуклеиновые кислоты. Некоторые аспекты структуры и функции. Киев: Наук. думка, 1976, с. 125-167.
7. Васильева Н. Г., Тукало М. А., Крикливый П. А., Мацука Г. Х. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, № 5, с. 1321-1325.
8. Sprinzl M., Moll J., Meissner F., Hartmann T. Nucl. Acids Res., 1985, Suppl., v. 13, p. r1-r207.
9. Vlassov V., Giege R., Ebel J.-P. Eur. J. Biochem., 1981, v. 119, № 1, p. 51-59.
10. Teeter B., Quigley G. J., Rich A. In: Metal ions in genetic information transfer/Ed. Gunther L., Eichhorn L., Luigi G. Marzilli. North-Holland, N. Y.: Elsevier, 1981, p. 233-272.
11. Jack A., Ladner J. E., Klug A. J. Mol. Biol., 1976, v. 108, № 4, p. 619-649.
12. Brennan T., Sundaralingam M. Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 11, p. 3235-3251.
13. Sundaralingam M. In: Conformation in biology, the festschrift celebrating the sixtieth birthday of G. N. Ramachandram F.R.S./Eds Srinivasan R., Sarma R. H. N. Y.: Adenine Press, 1983, p. 191-215.
14. Lawley P. D., Shan S. A. Biochem. J., 1972, v. 128, № 1, p. 117-132.
15. Reiter B., Bonnet J., Ebel J.-P. Eur. J. Biochem., 1974, v. 50, № 1, p. 281-288.
16. Silberklang M., Gillum A. M., Bajbhandary U. L. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 12, p. 4091-4108.
17. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 8, p. 2527-2538.

Поступила в редакцию
12.II.1986
После доработки
16.IV.1986

IDENTIFICATION OF PHOSPHATE RESIDUES INVOLVED IN THE FORMATION OF SPATIAL STRUCTURE OF tRNA^{Leu}_{IAG} FROM COW MAMMARY GLAND

PETRUSHENKO Z. M., TUKALO M. A., MATSUKA G. KИ.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev*

The phosphates of the tRNA^{Leu}_{IAG} from cow mammary gland (tRNA which has a long variable loop) participating in the formation of three-dimensional structure were studied by alkylation with ethylnitrosourea and methylnitrosourea. A low degree of modification was observed for the phosphates of the following nucleotides: 7, 8, 9, 10 (at the bend site between the acceptor and D-stem); 18, 19, 20A and 21 in the D-loop; 47H and 49 at the joint of variable and T-stem; 57, 58 and 59 in the T-loop.